

УНИВЕРЗИТЕТ “СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ”

Фармацевтски факултет, Скопје

Институт за применета биохемија

Катедра по токсикологија

Даринка Ѓоргиева

**ГЕНОТОКСИЧНИ ЕФЕКТИ НА КСЕНОБИОТИЦИ:
КОМПАРАТИВНО ИСТРАЖУВАЊЕ СО РАСТИТЕЛНИ
МОДЕЛИ**

- магистерски труд -

Скопје, 2011 год.

ДАРИНКА ЃОРГИЕВА

ГЕНОТОКСИЧНИ ЕФЕКТИ НА КСЕНОБИОТИЦИ: КОМПАРАТИВНО ИСТРАЖУВАЊЕ СО РАСТИТЕЛНИ МОДЕЛИ

АПСТРАКТ

Со брзиот економски развој и индустријализација, широк спектар на генотоксични хемикалии се продуцираат и дистрибуираат во животната средина. Токсичните хемикалии влијаат врз индивидуалното здравје кога интерферираат со нормалните физиолошки процеси во организмите. Тешките метали ја сочинуваат една од најголемите групи на загадувачи на животната средина кои се сериозна закана за општата состојба во биосферата. Иако есенцијалните метали имаат важна биолошка функција како кофактори на многу металопротеини и ензими, кога се акумулираат во клетките имаат цитотоксичен ефект.

Фитотоксичноста на металите е поврзана со индуцирање оксидативен стрес поврзан со оксидација на протеините и мембранските липиди, како и специфичен одговор со DNA оштетување. Поради строго регулираната структура на генетскиот материјал, возможно е да се користат најразлични растителни и животински видови во тестовите за генотоксичност. Претставниците од класата виши растенија обезбедуваат користен генетски систем за скрининг и мониторирање на најразлични ксенобиотици.

Случајно амплифицираната полиморфна DNA (RAPD) техника е употребена за детектирање на индуцираните DNA оштетувања од метали кај *Phaseolus vulgaris* L. како експериментален модел систем и четири други видови растенија [*Taraxacum officinale* (Asteraceae), *Matricaria recutita* L. (Asteraceae), *Urtica dioica* (Urticaceae) и *Robinia pseudoacacia* L. (Fabaceae)] собрани од локалитети со различна експозиција на метали. Евидентиран е полиморфизам во добиените RAPD-профили во вид на исчезнување и/или појавување на фрагменти во DNA отпечатокот на примероците изложени на метали во споредба со контролниот примерок.

DNA полиморфизмот детектиран со RAPD анализата е ефикасен биомаркер за детектирање генотоксичност на ксенобиотици кај растителни модел системи.

Клучни зборови: растенија, тешки метали, RAPD, DNA оштетување, *Phaseolus vulgaris*

DARINKA GJORGIEVA

**GENOTOXIC EFFECTS OF XENOBIOTICS:
COMPARATIVE INVESTIGATION WITH PLANT MODEL SYSTEMS**

ABSTRACT

Impact assessment of environmental pollutants is an important issue in ecogenotoxicology. With fast economic development and industrialization, a vast range of genotoxic chemicals were produced, and distributed in the environment. Toxic chemicals adversely affect individual health when they interfere with normal physiological processes of an organism. Heavy metals constitute one of the major groups of genotoxic environmental pollutants possessing serious threat to human as well as environmental wellbeing. Although essential metals carry out important biological functions because they act as cofactors for a wide variety of metalloproteins and enzymes, they are cytotoxic when they accumulate in excess of cellular needs.

Heavy metal toxicity in plants is related with induce of oxidative stress linked to oxidation of proteins and membrane lipids but also to alterations of DNA damage response.

Due to the highly conserved structure of the genetic material, it is possible to use a broad variety of species including bacteria, yeasts, animals and plants in genotoxicity tests. Higher plants provide a useful genetic system for screening and monitoring environmental pollutants.

A random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to detect genotoxic-induced DNA damage in *Phaseolus vulgaris* L. as experimental model system and four other plant species [*Taraxacum officinale* (Asteraceae), *Matricaria recutita* L. (Asteraceae), *Urtica dioica* (Urticaceae) and *Robinia pseudoacacia* L. (Fabaceae)] sampled from areas with different exposition on metals. Polymorphisms became evident as disappearance and/or appearance of DNA fragments in treated samples compared with control one.

DNA polymorphism detected by RAPD analysis offered a useful biomarker assay for detecting genotoxicity of toxic chemicals in plant model systems.

Keywords: plants, heavy metals, RAPD, DNA damage, *Phaseolus vulgaris*

Содржина

Апстракт.....	4
Листа на кратенки.....	6
1. ОПШТ ДЕЛ.....	9
1.1 Генотоксикологија и генотоксични ефекти на ксенобиотици	9
1.2 Тестирање на генотоксични супстанции	11
1.3 PCR базирани техники за детекција на DNA оштетувања.....	13
1.4 Случајно амплифицирана полиморфна DNA (Random amplified polymorphic DNA - RAPD).....	14
1.5 Предности, ограничувања и оптимизација на RAPD техниката.....	16
1.6 Употреба на RAPD во гено-екотоксикологијата.....	17
1.7 Интерпретација на промените во RAPD профилот.....	18
1.8 Биоиндикатори и биомаркери.....	20
1.9 Растенијата како биоиндикатори.....	21
1.10 Металите како ксенобиотици.....	22
1.11 Генотоксичен ефект на металите.....	24
2. ЦЕЛ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО.....	26
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН ДЕЛ.....	27
3.0 Материјали и методи.....	27
3.1 Материјали	27
3.2 Апаратура, реагенси и протоколи за работа.....	30
3.2.1 Апаратура.....	30
3.2.2 Протокол за RAPD-PCR анализата.....	30
3.2.3 Работни услови на ICP-AES системот.....	30
3.2.4 Протокол за FRAP-тест.....	31
3.2.5 Реагенси и хемикалии.....	32
3.3 Методи.....	33

3.3.1	Третирање на примероците семе од експерименталниот модел систем <i>Phaseolus vulgaris</i> (<i>Fabaceae</i>)	33
3.3.2	REI- тест за следење на метал-индуцирани морфолошки промени.....	35
3.3.3	Подготовка на примероците за анализа на метали со ICP-AES....	36
3.3.4	RAPD-PCR анализа.....	36
3.3.5	FRAP-тест.....	39
3.3.6	Статистичка обработка на податоците.....	40
4.	РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	41
4.1	Експериментален модел систем (<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Fabaceae</i>).....	41
4.1.1	ICP-AES анализа за содржина на метали.....	41
4.1.2	Тест за инхибиција на растот на коренот (REI).....	43
4.1.3	Тест за определување на вкупното ниво на антиоксиданси – FRAP.....	44
4.1.4	RAPD-PCR анализа.....	47
4.2	Растителни модел системи за генотоксичност во природни услови.....	66
4.2.1	ICP-AES анализа за содржина на метали.....	67
4.2.2	Тест за определување на вкупното ниво на антиоксиданси – FRAP.....	74
4.2.3	RAPD-PCR анализа.....	77
5.	ЗАКЛУЧОК	86
6.	ЛИТЕРАТУРА.....	88
7.	ПРИЛОГ	96